

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-328969

(43)Date of publication of application : 14.12.1993

(51)Int.Cl.

C12N 9/12
C12N 1/21
C12N 15/54
//(C12N 1/21
C12R 1:19)
(C12N 15/54
C12R 1:01)

(21)Application number : 04-355751

(71)Applicant : NEW ENGLAND BIOLABS INC

(22)Date of filing : 18.12.1992

(72)Inventor : COMB DONALD G
PERLER FRANCINE
KUCERA REBECCA
KONG HUIMIN
JACK WILLIAM E

(30)Priority

Priority number : 91 809822 Priority date : 18.12.1991 Priority country : US

(54) PURIFIED THERMOSTABLE DNA POLYMERASE OBTAINABLE FROM PYROCOCOCCUS SPECIES

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a new thermostable enzyme having high thermal stability and exhibiting a 3'-5' proof reading exonuclease activity.

CONSTITUTION: This purified thermostable enzyme obtained from Pyrococcus species catalyzing the polymerization of DNA is a DNA polymerase having a mol.wt. of about 92,000-97,000 dalton, a half-life of about 8 hr at 100° C and a half-life of 23 hr at 95° C.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 14.09.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-328969

(43)公開日 平成5年(1993)12月14日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 1 2 N 9/12	Z N A	7823-4B		
1/21		7236-4B		
15/54				
// (C 1 2 N 1/21				

8931-4B

C 1 2 N 15/ 00

A

審査請求 未請求 請求項の数15(全 17 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-355751

(22)出願日 平成4年(1992)12月18日

(31)優先権主張番号 8 0 9 8 2 2

(32)優先日 1991年12月18日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 592239707

ニュー・イングランド・バイオレイブズ・
インコーポレイテッド

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・

01915、ビバリー、トザー・ロード・32

(72)発明者 ドナルド・ジー・コーム

アメリカ合衆国、マサチューセッツ・

01915、ビバリー、ウォーター・ストリー
ト・109

(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 *Pyrococcus*種から得られる精製耐熱性DNAポリメラーゼ

(57)【要約】

【構成】 DNAの重合を触媒する*Pyrococcus*種から得られる耐熱性酵素。この耐熱性酵素は、約92,000~97,000ダルトンの見掛けの分子量と、100℃で約8時間及び95℃で23時間の半減期を有するDNAポリメラーゼである。

【効果】 従来公知のDNAポリメラーゼよりも高い耐熱性を有し、かつ、3'-5'ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ活性を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 DNAの重合を触媒する *Pyrococcus* 種から得られる精製耐熱性酵素。

【請求項2】 約92,000～97,000ダルトンの分子量を有する請求項1記載の耐熱性酵素。

【請求項3】 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する請求項1記載の耐熱性酵素。

【請求項4】 3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性が不活性化される請求項3記載の耐熱性酵素。

【請求項5】 前記酵素が *E. coli* NEB#720から得られる請求項1記載の耐熱性酵素。

【請求項6】 100℃で約8時間の半減期を有する請求項1記載の耐熱性酵素。

【請求項7】 95℃で約23時間の半減期を有する請求項1記載の耐熱性酵素。

【請求項8】 請求項1記載の耐熱性酵素をコードする単離されたDNA配列。

【請求項9】 請求項8記載のDNA配列を含有するベクター。

【請求項10】 請求項9記載のベクターで形質転換された微生物宿主。

【請求項11】 前記形質転換体が *E. coli* NEB#720 (ATCC No. 68723) である請求項10記載の形質転換体。

【請求項12】 *Pyrococcus* 種DNAポリメラーゼの発現に適した条件下で請求項10又は11のいずれかに記載の形質転換微生物宿主を培養し、*Pyrococcus* 種DNAポリメラーゼを回収することを包含する、*Pyrococcus* 種DNAポリメラーゼの製造方法。

【請求項13】 請求項12記載の方法により産生される *Pyrococcus* 種DNAポリメラーゼ。

【請求項14】 前記DNAが介在DNA配列を含有する請求項8記載のDNA配列。

【請求項15】 (a) *Pyrococcus* 種から得られる耐熱性DNAポリメラーゼをコードするDNAから介在DNA配列を欠失させ；

(b) 工程(a)のDNAを発現ベクターに導入し；

(c) 工程(b)の発現ベクターで微生物宿主を形質転換し；

(d) *Pyrococcus* 種DNAポリメラーゼの発現に適した条件下で工程(c)の形質転換宿主を培養し；及び

(e) ポリメラーゼを回収する、工程を包含する *Pyrococcus* 種DNAポリメラーゼの発現を増大する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は極めて耐熱性の酵素に関する。さらに具体的には、本発明は *Pyrococcus*

s 種から得られる耐熱性DNAポリメラーゼに関する。

【0002】

【従来の技術】 DNAポリメラーゼは、DNA修復及び複製に関与する一群の酵素である。大腸菌 *E. coli* のような中温性微生物からのDNAポリメラーゼの単離に関して広範な研究がなされてきた。例えば、Bessmanら, *J. Biol. Chem.* (1957) 233:171-177及びButtinとKornberg *J. Biol. Chem.* (1966) 241:5419-5427を参照されたい。

【0003】 大腸菌 *E. coli* から単離されるDNAポリメラーゼの例としては、大腸菌DNAポリメラーゼI、大腸菌DNAポリメラーゼIのKlenow断片、及びT4 DNAポリメラーゼが挙げられる。これらの酵素は、例えばニックトランスレーションによるDNAの標識化、cDNAクローニングにおける第二鎖cDNA合成、及びDNA合成を含めた組換えDNA技術への種々の用途を有する。Maniatisら, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982)を参照されたい。

【0004】 近年、米国特許第4,683,195号、第4,683,202号及び第4,800,159号は、核酸配列を増幅し、検出し及び／又はクローニングするための方法における上記の酵素の使用を開示している。一般にポリメラーゼ連鎖反応(PCR)と呼ばれるこの方法は、存在する核酸配列を増幅するためにポリメラーゼ、2つのプライマー及びヌクレオチドトリホスフェートの使用を必要とする。

【0005】 上記のいくつかのDNAポリメラーゼは、合成が1塩基対選択段階のみの結果である場合に有するものよりはるかに高い正確さでDNA複製を行なうブルーフリーディング機能を提供する3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する(Brutlag, D. とKornberg, A., *J. Biol. Chem.* (1972) 247:241-248)。3' - 5' ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼは、ブルーフリーディング活性を持たないDNAポリメラーゼと比較した場合、実質的に低い塩基取り込みエラー率を示す(Chang, L. M. S., *J. Biol. Chem.* (1977) 252:1873-1880)。

【0006】 例えば *Thermus Aquaticus* のような好熱性細菌からのDNAポリメラーゼの単離及び精製に関しても研究が行われてきた。Chien, A. ら, *J. Bacteriol.* (1976) 127:1550-1557は、*T. aquaticus* YT1株から80℃の至適温度を有するDNAポリメラーゼの単離及び精製を開示している。Chienらの精製法は、4段階方法を包含する。これらの段階は粗抽出物の調製、DEAE-Sephadexクロマトグラ

フィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、及びDNAセルロース上でのクロマトグラフィーを包含する。Kaledinら、Biokhymiyay (1980) 45:644~651もT. aquaticus YT1株細胞からのDNAポリメラーゼの単離及び精製を開示している。Kaledinらの精製方法は、6段階方法を包含する。これらの段階は、粗抽出物の単離、硫酸アンモニウム沈殿、DEAE-セルロースクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイト上での分画、DEAE-セルロース上での分画、及び一重鎖DNAセルロース上でのクロマトグラフィーを包含する。

【0007】米国特許第4,889,818号は、一重鎖DNAセルロース上でのクロマトグラフィーの代わりにホスホセルロースクロマトグラフィー工程を加えてKaledinの方法と実質的に同じ方法により調製される約86,000~約90,000ダルトンの分子量を有するT. aquaticusからの精製耐熱性DNAポリメラーゼ、即ちTaqポリメラーゼを開示している。さらに、欧州特許出願第0258017号は、上記のPCR法に使用するための好ましい酵素としてTaqポリメラーゼを開示している。

【0008】Taq DNAポリメラーゼは5'-3'ポリメラーゼ依存性エキソヌクレアーゼ機能を有する一方、3'-5'ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ機能を持たないことが研究により示された(Lawyer, F. C. ら, J. Biol. Chem. (1989) 264:11, p. 6427~6437; Bernad, A. ら, Cell (1989) 59:219)。その結果、Taq DNAポリメラーゼは塩基取り込みエラーを起こしやすく、ある種の応用へのその使用を望ましくないものになっている。例えば、増幅された遺伝子をクローニングする試みは、遺伝子のいずれかのコピーが無作為の間違った取り込みによりエラーを含み得るため、問題となる。複製サイクルの間にエラーが起こる場合には(例えば、初期複製サイクルにおいて)、増幅された全DNAが間違っており取り込まれた塩基を含有し得る、すなわち、突然変異型遺伝子産物を生じる。さらに、Taq DNAポリメラーゼが100℃で数分以下の耐熱性を有することが研究により示された。したがって、より高い熱安定性及び関連する3'から5'へのエキソヌクレアーゼブルーフリーディング活性を有するDNAポリメラーゼを、科学界は緊急に必要としている。このような酵素の1つである、海底の熱出口(thermal vents)近くの100℃近くの温度で生育する原始細菌であるThermococcus litoralisからのDNAポリメラーゼが最近単離され、大腸菌E. coli中でクローニングされた。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、一般に入手可能なDNAポリメラーゼよりも高い耐熱性を有す

る3'-5'ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ活性を示す精製DNAポリメラーゼを得ること及び生産することが、当業界では依然として望まれている。このような酵素の入手可能性は、上記のDNAポリメラーゼ法を改良することだろう。さらに、それは、このようなDNAポリメラーゼが組換えDNA技術により生産された場合には有用であろう。これにより、ポリメラーゼの高純度の商業的量の生産が可能になるだろう。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明の要約

本発明により、DNAの重合を触媒する、Pyrococcus種(sp.)から得られる耐熱性酵素が提供される。2010メートルの海底熱出口から単離された原始細菌であるPyrococcus種から得られる耐熱性酵素は、約92,000~97,000ダルトンの見掛けの分子量、100℃で約8時間の半減期、及び95℃で23時間の半減期を有するDNAポリメラーゼである。

【0011】Pyrococcus種から得られる92,000~97,000ダルトンの耐熱性DNAポリメラーゼをコードするDNAが単離されたが、これは本発明の耐熱性酵素を得るための別の手段を提供する。

【0012】Pyrococcus種DNAポリメラーゼは、3'-5'ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ活性を有する。本発明に従って、Pyrococcus種DNAポリメラーゼの3'-5'ブルーフリーディング活性は、T. litoralisから得られるDNAポリメラーゼの2.5倍であることが判明した。その結果、Pyrococcus種DNAポリメラーゼは、Taqポリメラーゼのような3'-5'ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ機能を持たない耐熱性ポリメラーゼよりもはるかに高い正確さを有するにちがいない。さらに、Pyrococcus種DNAポリメラーゼは、Taqポリメラーゼよりも、96℃~103℃の温度で実施的に高い耐熱性又は半減期を有する。

【0013】好ましい実施態様の詳細な説明

本発明はPyrococcus sp. GB-D株から得られるDNAポリメラーゼである耐熱性酵素に関する。Pyrococcus sp. は、Woods Hole Oceanographic Instituteの深海潜水可能な潜水艦Alvinを用いてHolger Jannaschが水深、2010メートルのホルテス(Cortez)海の海底熱出口から単離した。Pyrococcus sp. GB-D株の試料(原始細菌 NEB#732)は、ブダペスト条約下で、1991年10月1日にAmerican Type Culture Collectionに寄託され、ATCC受託番号第55239号が付与された。

【0014】この生物Pyrococcus sp.

は、65℃～103℃の生育範囲を有する極めて好熱性の硫黄代謝性原始細菌である。

【0015】無傷のタンパク質を回収するために、Belkinら、Arch. Microbiol. (1985) 142:181～186 (この記載内容は参照として本明細書中に含めるものとする)に記載された技法のような任意の好適な技術を用いて増殖させ得る。すなわち、その細胞を、95℃で2日間、15mlのネジ蓋付き試験管中、10mg/mlの硫黄及び0.01M システインを含有する上記のBelkinらが記載の培地で増殖させる。大量の細胞を必要とする場合には、1リットルのネジ蓋付き瓶を用いて、滅菌後、新鮮な10ml培養物を接種して、90℃～95℃で2日間増殖させる。

【0016】細胞増殖後、酵素を単離及び精製するための1つの好ましい方法を、以下の多段階方法を用いて成し遂げる：先ず、凍結している場合には融解し、好適な緩衝液、例えば緩衝液A (10mMのKPO₄ 緩衝液、pH7.4; 1.0mMのEDTA, 1.0mMのベータメルカプトエタノール)中に懸濁し、超音波処理して、遠心分離する。次に、上清を、Affigel-blueカラム (Biorad) のような核酸と結合するタンパク質に対する高親和性を有するカラムに通す。Pyrococcus sp. の上清溶液中に存在する核酸、及び多数のタンパク質がカラムから素通りし、カラム容量の数倍の量の約7.0のpHの低塩緩衝液でカラムを洗浄してそれらの物質を除去する。洗浄後、緩衝液Aに溶解した0.1～2.0MNaClのような直線勾配で酵素を溶離する。ピークDNAポリメラーゼ活性を透析し、ホスホセルロースカラムに載置する。このカラムを洗浄し、緩衝液A中の0.1～1.0MNaClのような直線勾配で酵素活性を溶出させる。ピークDNAポリメラーゼ活性を透析し、HPLCモノーSカラム (陽イオン交換体) に載置する。酵素を、緩衝液Aに溶解した0.05～1.0MNaClのような直線勾配で溶離する。酵素は、この段階で純度約50%である。

【0017】Pyrococcus sp. から得られるDNAポリメラーゼの見掛けの分子量は、分子量97,400と定められたホスホリラーゼBのような公知の分子量のタンパク質標準と比較した場合、約92,000～97,000ダルトンである。しかしながら、極度の好熱性細菌であるPyrococcus sp. のDNAポリメラーゼは、完全に変性しないために又はその他の固有の特性のために、異常な相対分子量位置に電気泳動される、と理解されるべきである。本発明の耐熱性酵素の正確な分子量は、Pyrococcus sp. DNAポリメラーゼ遺伝子のコード配列から確定し得る。溶離物質の分子量は、任意の方法、例えばタンパク質分子量マーカーを用いるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により確定し得

る。

【0018】ポリメラーゼ活性は、好ましくはDNAse処理又は活性化DNA中への放射標識デオキシヌクレオチドの取り込みにより測定する；その後のDNA基質からの非取り込みデオキシヌクレオチドの分離後、ポリメラーゼ活性はDNAを含有する酸不溶性画分中の放射能の量に比例する (Lehman, I. R. ら, J. Biol. Chem. (1958) 233:163. この記載内容は、参照として本明細書中に含めるものとする)。

【0019】100℃での本発明のDNAポリメラーゼの半減期は約8時間、95℃では約23時間である。DNAポリメラーゼの熱安定性又は半減期は、BSAを含有する反応緩衝液の存在下で問題の温度で予備インキュベーションして決定し得る。12時間までの範囲の予め決めた間隔で、少量のアリコートを取り出し、DNA基質、dNTPs及びBSAを含有する反応緩衝液に添加して、上記の方法を用いてポリメラーゼ活性に関してアッセイする。

【0020】本発明の耐熱性酵素は、この酵素をコードする遺伝子がPyrococcus sp. ゲノムDNAからクローニングされたものであるので、組換えDNA技術により産生してもよい。この遺伝子の部分的DNA配列は、配列番号1として配列表中に記載されている。Pyrococcus sp. DNAポリメラーゼに関する完全コード配列は、大腸菌E. coli, NEB#720中のpUC19中の約5KbのBamHI制限断片から得られる。この大腸菌株は、ブダベスト条約下で、1991年10月1日にAmerican Type Culture Collectionに寄託され、ATCC受託番号第68723号が付与された。

【0021】Pyrococcus sp. DNAポリメラーゼのクローニング

組換え型のPyrococcus sp. DNAポリメラーゼの製造は一般に、以下の工程を包含する：活性型のポリメラーゼ、即ちその天然型のポリメラーゼ、又は天然型ポリメラーゼから切断されても切断されなくてもよい、及び、ポリメラーゼ活性に作用しても作用しなくてもよい他の配列との融合体としてのポリメラーゼ、をコードするDNAを単離する。次に、該遺伝子は、原核生物又は真核生物宿主/ベクター系での発現のために適切な調節配列と操作可能なように結合されても結合されなくてもよい。ベクターは、好ましくは好適な宿主中での形質転換及び保持に必要な全機能をコードし、また、Pyrococcus sp. ポリメラーゼ発現のための選択可能マーカー及び/又は調節配列をコードし得る。ベクターは、好適な宿主を形質転換するために用いられる。活性な組換え耐熱性ポリメラーゼは、連続的に又は発現誘導後に、形質転換された宿主培養により製造し得る。活性な耐熱性ポリメラーゼは、宿主細胞内か

ら、又はタンパク質が細胞膜を通して分泌される場合には培地から回収し得る。

【0022】上記の工程の各々は多数の方法で達成し得るが、本発明に従って、*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼをコードするDNAをクローニングするために、大腸菌中でのポリメラーゼ自身の調節配列からのポリメラーゼの発現は高レベルの遺伝子発現を引き起こす。

【0023】本発明により、少なくとも1つの介在配列が*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼ遺伝子内に存在することが発見された。本発明の*Pyrococcus* sp. ポリメラーゼDNA及びタンパク質配列と、*Thermococcus litoralis* DNAポリメラーゼDNA及びタンパク質とを比較して、*Pyrococcus*の介在配列が保存されたp α モチーフ領域III内にあり、配列番号1のヌクレオチド1839で開始することを確定した。

【0024】クローニングベクター

本発明の実施に有用なベクターは、以下の制御特性のいくつか又はすべてを提供することにより*Pyrococcus* sp. ポリメラーゼの種々の程度の制御発現を提供する必要がある：(1) ポリメラーゼの開始部に直接隣接するか又は融合タンパク質としての、転写開始部位又はプロモーター、(2) 遺伝子発現させたり(on)止めたり(off)するために用い得るオペレーター、(3) 翻訳を改善するためのリボソーム結合部位、及び(4) 安定性を改善するための転写又は翻訳停止部位。*Pyrococcus* sp. ポリメラーゼのクローニング及び発現に用いられる適切なベクターとしては、例えばファージ及びプラスミドが挙げられる。ファージの例としては、 λ gt11 (Promega)、 λ DASH (Stratagene)、 λ Zap II (Stratagene)が挙げられる。プラスミドの例としては、pUC19、pBR322、pBluescript (Stratagene)、pSP73 (Promega)、pGW7 (ATCC No. 40166)、pET3A (Rosenbergら, Gene, (1987) 56:125~135)、及びpET11C (Methods in Enzymology (1990) 185:60~89)が挙げられる。

【0025】形質転換及び感染

標準プロトコールが、形質転換、ファージ感染及び細胞培養に関して存在する(Maniatisら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982))。プラスミド形質転換のために用い得る多数の大腸菌株のうち、好ましい株としては、JM101 (ATCC No. 33876)、XL1 (Stratagene)、RRI (ATCC No. 31343)、及びBL21 (DE3) plys S (Methods in Enzymology (1

990)、上掲)が挙げられる。大腸菌*E. coli* XL1、ER1578及びER1458株(Raleighら, N. A. Research (1988) 16:1563~1575)は、 λ ファージ用に使用し得る株であり、Y1089は λ gt11溶原性のために用い得る。Y1089における一過性溶原菌を調製する場合(Arasuら, Experimental Parasitology (1987) 64:281~289)、ファージの一回大量投与により又は溶原性宿主との同時培養により、培養物を λ gt11組換えファージで感染させる。感染Y1089細胞は、好ましくは溶解一欠陥宿主/ファージ系内で組換えタンパク質の増大を生じさせるインデューサーIPTGの存在下で37℃で増殖させる。

【0026】ゲノムDNAライブラリーの作製及び耐熱性ポリメラーゼのスクリーニング

*Thermococcus litoralis*のDNAポリメラーゼ遺伝子から調製した放射性プローブとの交差ハイブリダイゼーションによる*Pyrococcus* ゲノムDNAライブラリーのプロービング(精査)により、*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼ遺伝子での同定及び単離が可能になった。

【0027】*Pyrococcus* sp. DNAは、Maniatisら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982) (この記載内容は、参照として本明細書中に含めるものとする)が記載した方法により単離し得る。一旦単離された*Pyrococcus* sp. DNAは、無作為断片又は制限酵素断片としてゲノムライブラリーを作製するのに用い得る。後者の方法が好ましい。好ましくは、BamH I部分は、Maniatisら(上掲)に記載されているような標準DNA制限技術を用いて、*Pyrococcus* sp. ゲノムDNAから調製される。他の制限酵素、例えばSal I及びXba Iを用いてもよい。

【0028】本発明に従って抗体又はDNAプローブ(YoungとDavis, PNAS (1983) 80:1194~1198; Maniatisら, 上掲)を用いて、プラスミド及びファージをスクリーニングするための方法が利用できるけれども、ファージ系は良好に働く傾向があり、したがって一次ライブラリーに好ましいことが判明した。

【0029】ゲノムライブラリーは、コロニー又はブランクハイブリダイゼーション法(Maniatisら, 上掲)を用いて、又は抗体ブランク反応性(YoungとDavis, 上掲)を用いてスクリーニングし得る。コロニー又はブランクハイブリダイゼーション法においては、プローブは、標識化の標準的方法、例えば関連のある生物、例えば*T. litoralis*からのポリメラーゼ遺伝子の無作為プライミング又はニックトランス

レーションにより形成される (Maniatisら, 上掲)。ゲノムライブラリーは、所望の厳格さに応じた条件下で標識プローブを用いてハイブリダイゼーションされる。

【0030】抗体／ブランク法を用いてゲノム発現ライブラリーをスクリーニングする場合は、*Pyrococcus* sp. 調節領域が大腸菌中で機能するか否かが不明確であるため、 λ gt11及び λ Zap IIのようなすべての必要な発現調節領域を供給するファージベクターが抗体スクリーニングには好ましい。 λ DASHのBamH I部位又は λ gt11のEcoR I部位中に*Pyrococcus* sp. DNAをクローニングすることにより、*Pyrococcus* sp. ポリメラーゼは、 λ gt11におけるベクターガラクトシダーゼとの融合タンパク質として又はそれ自体の内在性プロモーターから発現され得る。

【0031】一旦形成されると、発現ライブラリーは抗*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼ抗血清を用いて、又はそれが利用できない場合には密接に関連した生物 (即ち別の極度の耐熱性細菌である*Thermococcus litoralis*) のDNAポリメラーゼに対する抗体により、YoungとDavis, PNAS (1983) (上掲に記載されているような標準抗体ブランクハイブリダイゼーション法を用いて、スクリーニングし得る。

【0032】いずれかの方法を用いて、一部又は全遺伝子をコードする、一旦確認された*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼDNAを次に、例えばpBR322、pBluescript、M13又はpUC19中にサブクローニングし得る。所望により、例えばSangerジデオキシ鎖終止法 (Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. PNAS (1977) 74: 5463~5467) により、DNA配列を決定し得る。

【0033】*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼをコードするDNA及びその発現の確認

Pyrococcus sp. DNAポリメラーゼをコードするDNA配列が得られたということを確定するためのいくつかの方法がある。これらの例としては、例えば組換えDNAによりコードされるタンパク質の実際の又は推定上のアミノ末端配列を天然型のタンパク質と比較すること、又は組換えDNAが天然型の*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼに特異的な抗体と結合するタンパク質を産生するか否かを測定することが挙げられる。さらに、Wangら, FASEB Journal (1989) 3: 14~21による研究は、ポリメラーゼ α ファミリーからのDNAポリメラーゼ配列のある領域がPol I様ポリメラーゼにおける別のグループの保存領域と同様に多数の種 (species) の間で高度に保存されることを示唆している。その結

果、クローン化遺伝子の推定アミノ酸配列を公知のDNAポリメラーゼ、例えばヒトDNAポリメラーゼ α 及び大腸菌DNAポリメラーゼIのアミノ酸配列と比較することにより、これらの領域 (islands) の相同性の確認により、組換えDNAが実際DNAポリメラーゼをコードするという強力な証拠が提供される。

【0034】上記のように、本発明に従って、*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼをコードするDNAはpol α モチーフ領域III内にイントロンすなわち介在配列を含有することが判明した。したがって、大腸菌のような宿主細胞において過発現を増大することを意味するため、イントロンをコードするDNA配列を欠失し得る。DNA配列を欠失させ、したがってイントロンをin vitroでスプライシングするためにより用い得る当業者に公知の多数の方法がある。1つの方法は、スプライス部位又は欠失される領域近くのコード領域において非反復の制限酵素部位を確認することを包含する。二本鎖オリゴマーを合成して、2つの制限断片間のギャップを架橋する。アミノ末端制限断片、架橋オリゴ、及びカルボキシ末端制限断片から成る3部分連結 (3-part ligation) により、欠失イントロンをもつ天然型遺伝子が生じる。

【0035】別の方法は、上記の方法の変法である。イントロン内の、しかしコード配列境界近くに非反復の部位を有する制限酵素で切断することにより、大部分のイントロンを欠失させる。大部分のイントロンの欠失を含有する線状プラスミドと一緒に連結する。f1ヘルパーファージIR1による重感染により、一本鎖ファージをpBluescriptベクター組換え体から生成する。所望の最終配列を有する一本鎖オリゴマーを合成し、部分的にイントロンを欠失したファージDNAにアニリングする。したがって、残りのイントロンはループが解ける。大腸菌CJ236株中で元のファージを産生することにより、Kunkelの突然変異誘発法 (Methods in Enzymology, 154: 367 (1987)) を用いて完全欠失イントロン構築物を選択し得る。

【0036】イントロンを欠失させるために用い得るさらに別の方法は、DNA増幅を用いる。例えば、Maniatisら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), Vol. 2, 2nd edition (この記載内容は参照として本明細書中に含めるものとする) を参照されたい。すなわち、プライマーを生成して増幅し、次いで遺伝子のアミノ半分とカルボキシ半部分を結合させる。

【0037】上記の方法を用いてイントロンをin vitroで欠失させる場合、天然のスプライス部位は不明である。したがって、当業者は、活性酵素の産生を生じる、考え得るいくつかの人工的スプライス部位が存在すると予測するであろう。

【0038】一旦確認されれば、*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼをコードするDNA配列は、欠失イントロンを伴っても伴わなくても、大腸菌に由来するプラスミド、例えばpET3A、pBluescript又はpUC19、*Bacillus subtilis*に由来するプラスミド、例えばpUB110、pTP5及びpC194、酵母菌に由来するプラスミド、例えばpSH19及びpSH15、λファージのようなバクテリオファージ、*Agrobacterium tumefaciens*のような細菌、レトロウイルスのような動物ウイルス、並びにBaculovirusのような昆虫ウイルスといった適切な発現ベクター中にクローニングされ得る。

【0039】形質転換及びファージ感染のための標準技術を用いて、組換えベクターを適切な宿主中に導入する。例えば、Cohen, S. N., PNAS (1972) 69:2110 (この記載内容は参照として本明細書中に含めるものとする) により記載されたような塩化カルシウム法は、大腸菌のために用いる。桿菌*Bacillus*の形質転換は、Chang, S. ら, Molecular and General Genetics (1979) 168:111 (この記載内容は参照として本明細書中に含めるものとする) の方法に従って実施する。酵母菌の形質転換は、Parent ら, Yeast (1985) 1:83~138 (この記載内容は参照として本明細書中に含めるものとする) の方法に従って実施する。ある種の植物細胞は、Shaw, C. H. ら, Gene (1983) 23:315 (この記載内容は参照として本明細書中に含めるものとする) により記載された方法に従って、*Agrobacterium tumefaciens*で形質転換される。動物細胞の形質転換は、例えばVirology (1973) 52:456 (その記載内容は参照として本明細書中に含めるものとする) に記載の方法に従って実施する。Baculovirusによる昆虫細胞の形質転換は、例えばBiotechnology (1988) 6:47 (その記載内容は参照として本明細書中に含めるものとする) に記載の方法に従って実施する。

【0040】使用する宿主細胞に応じて、このような細胞に適した標準技術を用いて、形質転換体を培養する。例えば、大腸菌を培養するためには、30~42℃でLB培地中で中間対数増殖期又は静止期まで細胞を増殖させる。

【0041】*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼは、例えば培養細胞又は培養溶液からの抽出により形質転換宿主細胞の培養物から単離及び精製し得る。

【0042】*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼが培養細胞から抽出される場合、当業界で公知の方法、例えば遠心分離により、培養後に細胞を採集す

る。次に、採集細胞を適切な緩衝溶液中に懸濁し、超音波処理、リゾチーム及び／又は凍結融解により破碎する。遠心分離及び／又は濾過により、*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼを含有する粗抽出物が得られる。

【0043】*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼが培養溶液中に、即ち単独で又はマルトース結合タンパク質のような分泌タンパク質との融合タンパク質として、分泌される場合は、当業界で公知の方法、例えば遠心分離により、上清を細胞と分離する。

【0044】培養上清又は細胞抽出物中に含有される*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼの分離及び精製は、上記の方法により、又は公知の分離及び精製法を適切に組み合わせて実施し得る。これらの方法としては、例えば塩沈殿及び溶媒沈殿のような溶解性を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような分子量の差を利用する方法、イオン交換カラムクロマトグラフィーのような電荷の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーのような特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーのような疎水性の差を利用する方法、並びに等電点電気泳動のような等電点の差を利用する方法が挙げられる。

【0045】組換え体酵素を単離及び精製するための1つの好ましい方法は、以下のような多段階工程を用いて達成される：まず、細胞を、凍結している場合には融解して、好適な緩衝液、例えば緩衝液A (100mM NaCl, 25mM Tris, pH7.5, 0.1mM EDTA, 10%グリセロール, 0.05% Triton X-100) 中に懸濁し、溶解して、遠心分離する。次に透明な粗抽出物を約30分間、75℃に加熱する。変性タンパク質を遠心分離で除去する。次に上清を、核酸と結合するタンパク質に対して高親和性を有するカラム、例えばAffigel Blueカラム (Biorad) に通す。カラム容量の数倍量の約7.0のpHの低塩緩衝を用いてカラムを洗浄することにより、上清溶液中に存在する核酸及び多数のタンパク質がカラムを素通りし、それにより除去される。洗浄後、酵素を0.1M~1.5MのNaCl緩衝液Aのような線状勾配でDNAポリメラーゼ活性を溶離する。活性画分をプールし、透析して、ホスホセルロースカラムに載置する。カラムを洗浄し、DNAポリメラーゼ活性を、緩衝液B (100mM NaCl, 15mM KPO₄, 0.1mM EDTA, 10%グリセロール, 0.05% Triton X-100, pH6.8) に溶解した1.0~1.0M NaClの線状勾配で溶離する。画分を採集し、BSAを各画分に添加する。DNAポリメラーゼ活性を有する画分をプールする。得られた*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼを、上記の標準生成物精製法を用いてさらに精製する。

【0046】Pyrococcus sp. DNAポリメラーゼの安定化及びその用途

長期保存のために、本発明の耐熱性酵素は、以下の緩衝液中に保存する：0.05M NaCl、0.01M KPO₄ (pH7.4)、0.1mM EDTA及び50%グリセロール中に-20℃で保存する。本発明のPyrococcus sp. DNAポリメラーゼは、このような酵素が必要な又は望ましい任意の目的のために用い得る。例えば、cDNAクローニングにおける第二鎖cDNA合成及びDNA合成を含めた組換えDNA技術に用い得る(Maniatisら、上掲を参照のこと)。

【0047】本発明のPyrococcus sp. DNAポリメラーゼは、3'-5'エキソヌクレアーゼ機能を不活性化するために化学的に又は遺伝学的に修飾し得るし、このような修飾酵素が望ましい任意の目的、例えばDNA合成に用い得る。

【0048】例えば、遺伝学的修飾Pyrococcus sp. DNAポリメラーゼは、Pyrococcus sp. DNAポリメラーゼ遺伝子を無作為に突然変異誘発し、次にポリメラーゼ活性の損失を伴わずにエキソヌクレアーゼ活性を損失した突然変異体をスクリーニングすることにより、単離し得る。あるいは、遺伝学的に修飾したPyrococcus sp. DNAポリメラーゼは、好ましくはKunkel, T. A., PNAS (1985) 82:488~492 (その記載内容は参照として本明細書中に含めるものとする)に記載された特定部位突然変異法を用いて単離される。

【0049】さらに、本発明のPyrococcus sp. DNAポリメラーゼは、例えば米国特許第4,683,195号、第4,683,202号及び第4,800,159号に開示された手法により、DNAを増幅するために用いてもよい。

【0050】

【実施例】以下の実施例は、実施するのが好ましい本発明の実施態様を説明するために与えられる。これらの実施例は例示的なものであり、請求の範囲に記載されたものを除いて、本発明を限定するものではないと理解されるべきである。

【0051】実施例I

Pyrococcus 種からの耐熱性DNAポリメラーゼの精製

Pyrococcus sp. GB-D株 (ACTT No. 55239) を、94℃で2日間、8本の1リットル瓶中の10g/lの硫黄元素を含有する、Belkinら (上掲) により記載された培地中で増殖させた。細胞を室温に冷却し、未使用硫黄を捨てて分離し、遠心分離により採集して、-70℃で保存した。細胞の収率は1.4g/lであった。

【0052】上記のようにして得られた11.5gの細

胞を、0.1MのNaClを含有する28mlの緩衝液A (10mM KPO₄ 緩衝液, pH7.4; 0.1mM EDTA, 0.1mM ベーターメルカプトエタノール) に懸濁して、4℃で5分間、超音波処理した。溶解物を15,000gで4℃で30分間遠心分離した。上清溶液を18mlのAffigel blueカラム (Biorad) に通した。次に、カラムを、0.1M NaClを含有する50mlの緩衝液Aで洗浄した。カラムを、緩衝液Aに溶解した300mlの0.1~2.0M NaClの線状勾配で溶離した。DNAポリメラーゼは、約1.3M NaClで単一ピークとして溶離し、適用した活性の90%を示した。DNAポリメラーゼ (25ml) のピーク活性を、100mMのNaClを含有する1リットルの緩衝液Aに対して透析し、次に、100mMのNaClを含有する緩衝液Aで平衡化した15mlのホスホセルロースカラムに載置した。カラムを、100mMのNaClを含有する緩衝液A 50mlで洗浄し、緩衝液Aに溶解した0.1~1.0MのNaClの線状勾配200mlを用いて酵素活性を溶離した。活性は0.6M NaClの位置で単一ピークとして溶離し、適用した活性の70%を示した。プールした活性 (42ml) を500mlの緩衝液Aに対して透析し、25mlのDEAEカラムに載置した。カラムを、0.1M NaClを含有する緩衝液A 50mlで洗浄し、酵素活性の2/3がカラムを素通りした。活性画分をプールし (30ml)、1.0mlのHPLCモノ-Sカラム (Pharmacia) に載置して、0.05~1.0M NaClの緩衝液A中の線状勾配100mlで溶離した。活性は0.22M NaClで単一ピークとして溶離し、適用した活性の80%を示した。

【0053】精製Pyrococcus sp. ポリメラーゼを、前記のようSDS 10~20%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、Coomassie Blue又はコロイド染色 (ISS Problue) で染色して、タンパク質を検出した。わずかに染まったタンパク質バンドが、約92,000~97,000ダルトンで観察された；この分子量測定は、同一ゲル上で以下のマーカータンパク質 (Bethesda Research Laboratories) : ミオシン 200,000ダルトン；ホスホリラーゼB 97,400ダルトン；BSA 68,000ダルトン；卵白アルブミン 43,000ダルトン；カルボン酸アンヒドラーゼ 29,000ダルトン；b-ラクトグロブリン 18,400ダルトン；リゾチーム 14,300ダルトンの移動と比較して得られた。

【0054】実施例II

Pyrococcus sp. DNAポリメラーゼ遺伝子のクローニング

Thermococcus litoralisのDN

Aポリメラーゼ遺伝子から調製した放射性プローブを用いた*Pyrococcus*ゲノムDNAライブラリーの交差ハイブリダイゼーションにより、*Pyrococcus* DNAポリメラーゼをコードするDNAの同定及び単離が可能になった。これは、下記のようにして達成された。

【0055】制限酵素が*Pyrococcus*ゲノムライブラリーの調製に最も有用であることを確定するために、*Pyrococcus* sp. DNAを、*Eco*RI、*Bam*HI及び*Hind*IIIで完全に切断した。このDNAを、以下のように調製したDNAプローブを用いてアガロースゲル電気泳動し（図1のA）、かつサザーンハイブリダイゼーションに掛けた（図1のB）。市販のランダムプライミングキット（New England Biolabs, Inc.）中に鋳型として*Thermococcus litoralis* DNAポリメラーゼ遺伝子（bp1~1274。バクテリオファージ NEB#618, ATCC No. 40794から得られる）の第一*Eco*RI断片約1μgを含有する反応混合物を37℃で1時間インキュベートして、高い特異活性を有するDNAプローブを精製した。プローブを、中等度に厳格な条件（ハイブリダイゼーション：50℃，4× SET，0.1M リン酸ナトリウム，pH7，0.1%ピロリン酸ナトリウム，0.1% SDS，1×Denhardt's溶液で一夜；洗浄条件；3×20~30分，45℃，0.1×SET，0.1Mリン酸ナトリウム，pH7，0.1%ピロリン酸ナトリウム，0.1% SDS。Maniatisら上掲）下で上記で調製した*Pyrococcus* sp. DNAに対してハイブリダイゼーションした。約5Kbの単一主バンドが、*Bam*HIで切断した*Pyrococcus* DNAで検出された。*Eco*RI及び*Hind*IIIはこのプローブを用いて多数のバンドを示したが、これはこれらの酵素が*Pyrococcus*ポリメラーゼ遺伝子内で切断されたことを示す。

【0056】これらの結果に基づいて、ファージベクターλDASH（Stratagene）を用いて、*Bam*HIゲノムライブラリーを作製した。*Pyrococcus* DNAの部分的及び完全*Bam*HI消化物を調製した。部分的及び完全*Bam*HI消化DNAの混合物を、λDASHの*Bam*HI部位に連結した。この連結混合物をメーカーの指示に従ってGigapack Gold（Stratagene）を用いてパッケージングし、大腸菌ER1458上にプレーティングした。パッケージングしたファージライブラリーは、1×10⁶ ファージ/mlを含有した。

【0057】*T. litoralis* DNAポリメラーゼ遺伝子（NEB#619, ATCC No. 40795から入手可能）の3つの断片（配列番号2，bp1~1274，1656~2660及び3069~37

37）の³²P-標識DNAプローブを、ランダムプライマーキット（New England Biolabs, Inc.）を用いて調製した。プローブをBenton & Davisの方法に従って用いて（Maniatisら、上掲）、上記のハイブリダイゼーション条件を用いて、*Pyrococcus*ゲノムライブラリーをスクリーニングした。約1%のブランクが陽性であって、10個の陽性ブランクを摘み取って、3回再感染及び再プレーティングして（90~100%のブランクが各々の単離物に関して陽性になるまで）精製した。ファージの平板溶解物（Maniatis, 上掲）を各単離物から調製し、これを用いて大腸菌培養物を感染させた。0.1mlの各平板溶解物を0.2mlの細胞と混合した（OD 600:2）。細菌細胞を溶解直前に収穫し、0.05M NaCl, 0.01M Tris (pH8.0), 0.1mM EDTA, 0.1% Triton X-100及び200μg/mlのリゾチム（3容量/細胞容量）中に懸濁し、約1分間、又は細胞溶解が生じるまで37℃に加熱した。溶解抽出物をただちに75℃で30分間加熱し、遠心分離して、上清溶液を、上記の方法に従って耐熱性DNAポリメラーゼ活性に関してアッセイした。10個の単離物のうち3個は有意のポリメラーゼ活性を示し、最高の活性を示すクローン（B9）をさらに調べた。

【0058】ファージDNAをB9から単離し、挿入DNAを制限酵素消化によって調べた。*Sa*Iによる消化は、λDASHの予測された2本のアーム+15Kb挿入物を生じた。*Bam*HIによる消化は、λDASHの2本のアーム+7.4.8及び3Kbの3挿入断片を生じた。これらの断片の各々をアガロースゲル電気泳動により精製し、溶離して、pUC19の*Bam*HI部位に連結した。連結混合物を用いて、プラスミドが挿入物を含有する場合に白色コロニーを生じ、指示寒天培地（X-gal+IPTG）上に挿入物を含有しない場合に青色コロニーを与える大腸菌ER2207を形質転換した。白色コロニー突然変異体は、7Kb断片を用いて得た。3つの白色コロニー及び27の青色コロニーは4.8Kb断片を、20白色及び21青色コロニー形質転換体は3Kb断片を用いて得られた。3つの4.8Kb白色コロニー形質転換体はすべて、熱安定なDNAポリメラーゼ活性を発現した。3Kb断片を有する形質転換体はいずれも熱安定なポリメラーゼ活性を発現しなかった。4.8Kb *Pyrococcus* DNA断片を有する3コロニーはすべて耐熱性DNAポリメラーゼに関してほぼ同一の特異的活性を有し、1つをさらに研究するために採取した（NEB#720）。NEB#720と呼ばれるこのクローンは、ブダベスト条約下で、1991年10月1日にAmerican Type Culture Collection（12301 Parklawn Drive, Rockville,

Maryland) に受託番号 ATCC No. 68723 として寄託した。NEB#720 は、DNA ポリメラーゼ活性 1700 単位/細胞 1g を生じ、この酵素の大量生産に用いられた。

【0059】 *Pyrococcus* sp. DNA ポリメラーゼ遺伝子を含む 4.8 Kb BamH I 断片の制限エンドヌクレアーゼマップを図 2 に示す。この遺伝子の部分 DNA 配列は配列表に配列番号 1 として記載されている。本発明の *Pyrococcus* sp. ポリメラーゼ DNA 及びタンパク質配列と *Thermococcus litoralis* DNA ポリメラーゼ DNA 及びタンパク質配列とを比較することにより、少なくとも 1 つの介在配列が *Pyrococcus* DNA ポリメラーゼ遺伝子内に存在することを見出した。*Pyrococcus* 介在配列は保存された pol α モチーフ領域 III 内にあり、配列番号 1 のヌクレオチド 1839 で開始する。

【0060】 実施例 III

組換え *Pyrococcus* sp. DNA ポリメラーゼの精製

大腸菌 NEB#720 (ACTT No. 68723) を、37℃で、10g/l のトリプトン、5g/l の酵母菌抽出物、5g/l の NaCl 及び 100mg/l のアンピシリンを含む培地中で 25 リットルの発酵槽内で増殖させ、0.3mM IPTG を用いて中間指数増殖期で誘導し、さらに 4 時間インキュベートした。細胞を遠心分離により採集して、-70℃で保存した。

【0061】 92g の細胞を、融解し、緩衝液 A (100mM NaCl, 10mM KPO₄, pH7.4, 0.1mM EDTA, 0.1% Triton X-100 及び 200 μ g/ml リゾチーム) に懸濁して全容量を 350ml とした。混合液が極めて粘性になるまで細胞を 37℃でインキュベートして溶解した (約 5 分間)。粗抽出物を直ちに 75℃で 30 分加熱した。変性大腸菌タンパク質を遠心分離により取り出し、上清溶液を *Pyrococcus* sp. 耐熱性 DNA ポリメラーゼの単離に用いた。

【0062】 上清溶液を 0.3M NaCl 溶液とし、Buchner 漏斗中に作った DEAE セルロースカラム 2×30cm に通して、核酸を除去し、Affi-Gel Blue クロマトグラフィーカラム 4×10cm (125ml) に通して、0.3M NaCl、0.01M KPO₄ (pH7.4)、0.1mM EDTA を含有する 300ml 溶液で洗浄し、次いで同一緩衝液に溶解した 0.3~2.0M NaCl の 1500ml 勾配で溶離した。

【0063】 カラム画分を DNA ポリメラーゼ活性に関してアッセイした。簡単に説明すると、1~4 μ l の画分を、30 μ M の各 dNTP 及び ³H-標識 TTP、0.5mg/ml 活性化仔ウシ胸腺 DNA 及び 100 μ

g/ml アセチル化 BSA を含有する 50 μ l の DNA ポリメラーゼ緩衝液 (10mM KCl, 20mM Tris-HCl (24℃で pH8.8)、10mM (NH₄)₂SO₄、2mM MgSO₄ 及び 0.1% Triton X-100) 中で 75℃で 5~10 分インキュベートした。アッセイ混合液を Whatman 3mm フィルターにかけて濾液を 10% TCA で 3 回、その後冷エタノールで 2 回洗浄した。フィルターを乾燥後、DNA への ³H-TTP 取り込みを示す結合放射能を測定した。活性画分をプールし、0.1M NaCl、0.01M KPO₄ (pH7.4)、0.1mM EDTA に対して透析し、次いでホスホセルロースカラム 4×12cm (150ml) に通して、カラムを同一緩衝液 300ml で洗浄し、0.1~1.5M NaCl の線状勾配で溶離した。活性画分をプールし、等容量の H₂O で希釈し、1.0ml の Pharmacia HPLC Mono Q カラムに通して、0.05~1.0M NaCl の線状勾配 60ml で溶離した。活性画分をプールし、-20℃で保存した。*Pyrococcus* sp. DNA ポリメラーゼは、Coomassie Blue 染色ゲルの肉眼的評価により測定した場合にこの段階で純度約 50% であって、70,000~100,000 単位/mg の DNA 合成に対する特異的活性を有し、粗抽出物中に存在する酵素活性の 8% を示した。精製ポリメラーゼは実質的に汚染 DNA 及び汚染ヌクレアーゼを含有しなかった。

【0064】 DNA ポリメラーゼ活性は、図 3 の 92,000~97,000Kd の Coomassie Blue 染色の主バンドに対応した。これは、以下の方法で測定される。SDS 10~20% ポリアクリルアミドゲルにおける電気泳動後及び Coomassie Blue での染色前に、ゲルを、1.0% Triton X-100、0.01M Tris-HCl (pH7.4) に一夜浸漬して、200ml づつ 3 回取り換えて、ゲルからドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を除去し、それを非イオン洗剤 Triton X-100 と置換する。最終洗浄後、ゲルを 0.1% Triton X-100、0.01M Tris-HCl (pH7.4) に 2 時間浸して、次に紙タオルで手短に乾かし、ガラス板上に広げる。ゲルを Whatman No. 54 濾紙片で被い、³²P-dCTP (10~20×10⁶ cpm/ μ mol) を含有する 0.3ml のアッセイ緩衝液を濾紙中央に添加した。液体を濾紙の縁に向けて拡散させた後、第二のガラス板を濾紙の上に置き、ガラス-ゲル-濾紙-ガラスサンドイッチをテープで一緒にぴったり貼り付けて、75℃で 60 分間インキュベートした。濾紙をゲルからはずして、1mM dCTP を含有する 10% TCA で 3 回 (30 分づつ洗浄)、イソプロパノールで 2 回洗浄した。濾紙を風乾し、X 線フィルムに一夜露出させた。現像した場合に、フィルム上の黒点は染色ゲ

ル上の92,000~97,000Kd Coomassie Blueバンド上に二重焼き付けされるが、これは図3のゲル上の主バンドがDNAポリメラーゼであることを示す。

【0065】*Thermococcus litoralis*から得られる密接に関連したDNAポリメラーゼに対して調製した抗体を用いた精製組換えタンパク質のウエスタンブロット分析(Towbinら, PNAS (1979))は、Coomassie Blue染色バンドと同じ92,000~97,000Kdの位置に、また、ゲル上のほぼ同じ位置に主バンドを示した(図4)。

【0066】実施例IV

3'-5' ブルーフリーディング活性の測定

1. デオキシヌクレオチドの非存在又は存在に対する *T. litoralis* DNAの反応

ポリメラーゼに関連したエキソヌクレアーゼ活性のレベルは、デオキシヌクレオチドに対して非常に異なる反応(又は応答)を示す。非ブルーフリーディング5'-3'エキソヌクレアーゼはデオキシヌクレオチドの存在によって影響を受ける付随的重合によって10倍又はそれ以上刺激されるが、一方ブルーフリーディング3'-5'エキソヌクレアーゼは付随的重合により完全に阻害される(Lehman, I. R., ARB (1967) 36:645)。

【0067】*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼ又は、十分特性化されたエキソヌクレアーゼ機能を有するポリメラーゼ(T4ポリメラーゼ, Klenow断片)を、重合緩衝液(70mM Tris, 24℃でpH8.8)、2mMMgCl₂、0.1% Triton及び100μg/ml ウシ血清アルブミン)に溶解した1μgの³H-チミジン標識二本鎖DNA(10⁵ CPM/μg)と共にインキュベートした。70℃(好熱性ポリメラーゼ)又は37℃(中温性ポリメラーゼ)で3時間(実験1)又は4時間(実験2)のインキュベーション時間後、酸可溶性放射標識塩基を測定することにより、エキソヌクレアーゼにより加水分解された塩基を定量した。

【0068】表1に示すように、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を有するTaq DNAポリメラーゼは、デオキシヌクレオチドが30μMで存在した場合にエキソヌクレアーゼ活性の刺激を示す。しかしながら、3'-5'ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ、例えばT4ポリメラーゼ、大腸菌ポリメラーゼIのKlenow断片、*T. litoralis* DNAポリメラーゼ又は*Pyrococcus* DNAポリメラーゼは、逆の、デオキシヌクレオチドの存在に対して阻害反応を示した。

【0069】

【表1】

表1

DNAポリメラーゼの種類	酸可溶性CPM (エキソヌクレアーゼ活性)*		NTPS添加に及ぼす影響	
	dNTPSなし	30μM dNTPS	NTPS	
Taqポリメラーゼ	338	2339	8倍増	
T4ポリメラーゼ	*46001	10418	>4倍減	
<i>E. coli</i> Pol. IのKlenow断片	8757	408	22倍減	
<i>T. litoralis</i> ポリメラーゼ	8573	795	11倍減	
<i>Pyrococcus</i> sp. ポリメラーゼ	9798	1411	7倍減	

*アッセイの非直線範囲

2. *Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼと *Thermococcus litoralis* DNAポリメラーゼの3'-5'ブルーフリーディング活性の比較

Pyrococcus sp. DNAポリメラーゼの3'-5'エキソヌクレアーゼ活性をさらに特性化するために、両酵素を3'-5'ブルーフリーディングエキソヌクレアーゼ活性に関して同一DNA重合単位で比較した(図5)。結果は、等しいDNA重合単位では、*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼが*Thermococcus litoralis* DNAポリメラーゼの2.5倍のエキソヌクレアーゼ活性を有することを示した。これは、DNA合成中の正確さ(fid

elity) がより大きいことを示唆する。

【0070】実施例V

Pyrococcus sp. DNAポリメラーゼ半減期測定

実施例IIIで上記のように精製したPyrococcus sp. DNAポリメラーゼを、以下の方法で測定した。精製組換えPyrococcus sp. DNAポリメラーゼ(40単位/ml)をdNTP及びDNAを含有しない反应用緩衝液(反应用緩衝液: 10mM KCl、10mM (NH₄)₂SO₄、20mM Tris-HCl (25℃でpH8.8)、2mM MgSO₄、0.1% Triton X-100、0.1mg/ml BSAを補充)中で95又は100℃で予備インキュベーションした。図6に示した時点で、酵素混合物のアリコートを70℃で、[³H]標識dNTPs及びプライム化(primed)M13 DNA基質

配列

```

GGATCCCTCT CTTTTTGGA ACCCATACG TCATTCCTC AACCAAACT TCAGCATCGT 60
TGCAGTGGTC AGTGTGTCTG TGGGAGATGA AGAGGACGTC GATTTTCTG GGGTCTATCT 120
TGTATCTCCA CATTCTAACT AACGCTCCAG GCCCAGGATC AACGTAGATG TTTTGTCTCG 180
CCTTAATGAA GAAGCCACCA GTGGCTCTTG CCTGCGTTAT CGTGACGAAC CTCCACCAC 240
CGCCACCGAG AAAAGTTATC TCTATCATCT CACACCTCCC CCATAACATC ACCTGCTCAA 300
TTTTTAAGCG TTCTTAAAGG CTTAAATACG TGAATTTAGC GTAAATTATT GAGGGATTAA 360
GTATGATACT TGACGCTGAC TACATCACCG AGGATGGGAA GCCGATTATA AGGATTTTCA 420
AGAAAGAAAA CGCGAGTTT AAGGTTGAGT ACGACAGAAA CTTTAGACCT TACATTTACG 480
CTCTCTCAA AGATGACTCG CAGATTGATG AGGTTAGGAA GATAACGCC GAGAGGCATG 540
GGAAGATAGT GAGAATTATA GATGCCGAAA AGGTAAGGAA GAAGTTCCTG GGGAGGCCGA 600
TTGAGGTATG GAGGCTGTAC TTTGAACACC CTCAGGACGT TCCCGCAATA AGGATAAGA 660
TAAGAGAGCA TTCCGAGTT ATTGACATCT TTGAGTACGA CATTCCGTT CCGAAGAGGT 720
ACCTAATAGA CAAAGGCCTA ATTCCAATGG AAGGCGATGA AGAGCTCAAG TTGCTCGCAT 780
TTGACATAGA AACCTCTAT CACGAAGGGG AGGAGTTCGC GAAGGGGCCC ATTATAATGA 840
TAAGCTATGC TGATGAGGAA GAAGCCAAAG TCATAACGTG GAAAAGATC GATCTCCCGT 900
ACGTCGAGGT AGTTTCCAGC GAGAGGGAGA TGATAAAGCG GTTCTCAAG GTGATAAGG 960
AGAAAGATCC CGATGTTATA ATTACCTACA ACGGCGATTC TTTGACCTT CCCTATCTAG 1020
TTAAGAGGGC CGAAAAGCTC GGGATAAAGC TACCCCTGGG AAGGGACGGT AGTGAGCCAA 1080
AGATGCAGAG GCTTGGGGAT ATGACAGCGG TGGAGATAAA GGAAGGATA CACTTTGACC 1140
TCTACCACGT GATTAGGAGA ACGATAAACC TCCCAACATA CACCCTCGAG GCAGTTTATG 1200
AGGCAATCTT CGGAAAGCCA AAGGAGAAAG TTTACGCTCA CGAGATAGCT GAGGCCTGGG 1260
AGACTGAAAA GGGACTGGAG AGAGTTGCAA AGTATTCAAT GGAGGATGCA AAGGTAACGT 1320
ACGAGCTCGG TAGGGAGTTC TTCCAATGG AGGCCAGCT TTCAAGGTTA GTCGGCCAGC 1380
CCCTGTGGGA TGTTTCTAGG TCTTCAACTG GCAACTTGGT GGAGTGGTAC CTCCTCAGGA 1440
AGGCCTACGA GAGGAATGAA TTGGCTCAA ACAAGCCGA TGAGAGGGAG TACGAGAGAA 1500
GGCTAAGGGA GAGCTACGCT GGGGATACG TTAAGGAGCC GGAGAAAGG CTCTGGGAGG 1560
GGTTAGTTTC CCTAGATTTC AGGAGCCTGT ACCCTCGAT AATAATCACC CATAACGTCT 1620
CACCGGATAC GCTGAACAGG GAAGGTGTA GGAATACGA TGTCGCCCA GAGGTTGGGC 1680
ACAAGTTCTG CAAGGACTTC CCGGGTTTA TCCCAGCCT GCTCAAGAGG TTATTGGATG 1740
AAAGGCAAGA AATAAAAAGG AAGATGAAAG CTTCTAAAGA CCCAATCGAG AAGAAGATGC 1800
TTGATTACAG GCAACGGGCA ATCAAAATCC TGGCAAACAG CATTTTACCG GAAGAATGGG 1860
TTCCACTAAT TAAAAACGGT AAAGTTAAGA TATTCGCAT TGGGGACTTC GTTGATGGAC 1920
TTATGAAGGC GAACCAAGGA AAAGTGAAGA AAACGGGGGA TACAGAAGTT TTAGAAGTTG 1980

```

(それぞれ、終濃度0.2mM及び20nM)を含有する反応緩衝液中に4倍に希釈し、酸不溶性物質中への[³H]取り込みの初期速度を監視した。活性は、95℃又は100℃で処理する前に存在する活性に対して表わす。

【0071】図6に示すように、Pyrococcus sp. DNAポリメラーゼの95℃での半減期は23時間、100℃では8時間であった。

【0072】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 3420塩基対

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 不明(not relevant)

CAGGAATTCA TGCCTTTTCC TTTGACAGGA AGTCCAAGAA GGCCCGTGTA ATGGCAGTGA 2040
 AAGCCGTGAT AAGACACCGT TATTCCGGAA ATGTTTATAG AATAGTCTTA AACTCTGGTA 2100
 GAAAAATAAC AATAACAGAA GGGCATAGCC TATTTGTCTA TAGGAACGGG GATCTCGTTG 2160
 AGGCAACTGG GGAGGATGTC AAAATTGGGG ATCTTCTTGC AGTTCCAAGA TCAGTAAACC 2220
 TACCAGAGAA AAGGGAACGC TTGAATATTG TTGAACCTCT TCTGAATCTC TCACCGGAAG 2280
 AGACAGAAGA TATAATACTT ACGATTCCAG TTAAAGGCAG AAAGAACTTC TTCAAGGGAA 2340
 TGTGAGAAC ATTACGTTGG ATTTTGGTG AGGAAAAGAG AGTAAGGACA GCGAGCCGCT 2400
 ATCTAAGACA CCTTGAAAT CTCGGATACA TAAGGTTGAG GAAAATTGGA TACGACATCA 2460
 TTGATAAGGA GGGGCTTGAG AAATATAGAA CGTTGTACGA GAAACTTGTG GATGTTGTCC 2520
 GCTATAATGG CAACAAGAGA GAGTATTTAG TTGAATTTAA TGCTGTCCGG GACGTTATCT 2580
 CACTAATGCC AGAGGAAGAA CTGAAGGAAT GCGTATTGG AACTAGAAAT GGATTAGAA 2640
 TGGGTACGTT CGTAGATATT GATGAAGATT TTGCCAAGCT TCTTGGCTAC TATGTGAGCG 2700
 AGGGAAGTGC GAGGAAGTGG AAGAATCAAA CTGGAGGTTG GAGTTACACT GTGAGATTGT 2760
 ACAACGAGAA CGATGAAGTT CTTGACGACA TGAACACTT AGCCAAGAAG TTTTGTGGA 2820
 AAGTCAAACG TGAAAGAAC TATGTTGAGA TACCAAGAA AATGGCTTAT ATCATCTTG 2880
 AGAGCCTTTG TGGGACTTTG GCAGAAAACA AAAGGGTTC TGAGGTAATC TTTACCTCAT 2940
 CAAAGGGCGT TAGATGGGCC TTCCTTGAGG GTTATTTTAT CGGCGATGGC GATGTTACCC 3000
 CAAGCAAGAG GGTTCGCCTA TCAACGAAGA GCGAGCTTTT AGTAAATGGC CTGTGTTCTCC 3060
 TACTTAATCT CTTGGAGTA TCTGCCATTA AGCTTGATA CGATAGCGGA GTCTACAGGG 3120
 TTTATGTAAA CGAGGAACCT AAGTTTACGG AATACAGAAA GAAAAAGAAT GTATATCACT 3180
 CTCACATTGT TCCAAAGGAT ATTCTCAAAG AAACCTTTGG TAAGGTCTTC CAGAAAAATA 3240
 TAAGTTACAA GAAATTTAGA GAGCTTGTAG AAAATGGAAA ACTTGACAGG GAGAAAGCCA 3300
 AACGCATTGA GTGTTACTT AACGGAGATA TAGTCCTAGA TAGAGTCGTA GAGATTAAGA 3360
 GAGAGTACTA TGATGGTTAC GTTACGATC TAAGTGTGTA TGAAGATGAG AATTCCTTG 3420

配列番号 : 2

鎖の数 :

配列の長さ : 5 8 3 7 塩基対

トポロジー : 不明

配列の型 : 核酸

配列

GAATTCGCGA TAAATCTAT TTTCTTCTC CATTTTCAA TTTCAAAAAC GTAAGCATGA 60
 GCCAAACCTC TCGCCCTTC TCTGTCTTC CCGCTAACCC TCTGAAAAC TCTCTCCAAA 120
 GCATTTTTTG ATGAAAGCTC ACGCTCCTCT ATGAGGGTCA GTATATCTGC AATGAGTTGC 180
 TGAAGGGTTA TTCTGTAGAA CAACTCCATG ATTTTCGATT TGGATGGGGG TTTAAAAATT 240
 TGGCGGAAC TTTATTTAAT TTGAACCTCA GTTTATATCT GGTGGTATTT ATGATACTGG 300
 AACTGATTA CATAACAAA GATGGCAAGC CTATAATCCG AATTTTAAAG AAAGAGAACG 360
 GGGAGTTTAA AATAGAACTT GACCTCATT TTCAGCCCTA TATATATGCT CTTCTCAAAG 420
 ATGACTCCGC TATTGAGGAG ATAAAGGCAA TAAAGGGCGA GAGACATGGA AAAACTGTGA 480
 GAGTGCTCGA TGCAGTAAA GTCAGGAAAA AATTTTGGG AAGGGAAGTT GAAGTCTGGA 540
 AGCTCATTTT CGAGCATCCC CAAGACGTT CAGCTATGCG GGGCAAAATA AGGGAACATC 600
 CAGCTGTGGT TGACATTTAC GAATATGACA TACCCTTTGC CAAGCGTTAT CTCATAGACA 660
 AGGGCTTGAT TCCCATGGAG GGAGACGAGG AGCTTAAGCT CCTTGCCTTT GATATTGAAA 720
 CGTTTTATCA TGAGGGAGAT GAATTTGGAA AGGGCGAGAT AATAATGATT AGTTATGCCG 780
 ATGAAGAAGA GGCCAGAGTA ATCAGATGGA AAAATATCGA TTTGCCGTAT GTCGATGTTG 840
 TGTCCAATGA AAGAGAAATG ATAAAGCGTT TTGTTCAAGT TGTTAAAGAA AAAGACCCCG 900
 ATGTGATAAT AACTTACAAT GGGGACAATT TTGATTTGCC GTATCTCATA AAACGGGCAG 960
 AAAAGCTGGG AGTTCCGGCT GTCTTAGGAA GGGACAAAGA ACATCCCGAA CCCAAGATTC 1020
 AGAGGATGGG TGATAGTTT GCTGTGGA TCAAGGGTAG AATCCACTTT GATCTTTTCC 1080
 CAGTTGTGCG AAGGACGATA AACCTCCCAA CGTATACGCT TGAGGCAGTT TATGAAGCAG 1140
 TTTTAGGAAA AACCAAAAGC AAATTAGGAG CAGAGGAAAT TGCCGCTATA TGGGAAACAG 1200
 AAGAAAGCAT GAAAAAATA GCCCAGTACT CAATGGAAGA TGCTAGGGCA ACGTATGAGC 1260
 TCGGGAAGGA ATTCTTCCCC ATGGAAGCTG AGCTGGCAAA GCTGATAGGT CAAAGTGTAT 1320

GGGACGTCTC GAGATCAAGC ACCGGCAACC TCGTGGAGTG GTATCTTTTA AGGGTGGCAT 1380
ACGCGAGGAA TGAAGTTGCA CCGAACAAAC CTGATGAGGA AGAGTATAAA CGGCGCTTAA 1440
GAACAACTTA CCTGGGAGGA TATGTAAAAG AGCCAGAAAA AGGTTTGTGG GAAAATATCA 1500
TTTATTTGGA TTTCCGCAGT CTGTACCCCT CAATAATAGT TACTCACAAC GTATCCCCAG 1560
ATACCCTTGA AAAAGAGGGC TGTAAGAATT ACGATGTTGC TCCGATAGTA GGATATAGGT 1620
TCTGCAAGGA CTTTCCGGGC TTTATTCCTT CCATACTCGG GGAATAATT GCAATGAGGC 1680
AAGATATAAA GAAGAAAATG AAATCCACAA TTGACCCGAT CGAAAAGAAA ATGCTCGATT 1740
ATAGGCAAAG GGCTATTAAA TTGCTTGCAA ACAGCATCTT ACCCAACGAG TGGTTACCAA 1800
TAATTGAAAA TGGAGAAATA AAATTCGTGA AAATTGGCGA GTTTATAAAC TCTTACATGG 1860
AAAAACAGAA GGAACCGTT AAAACAGTAG AGAATACTGA AGTTCTCGAA GTAAACAACC 1920
TTTTTGCATT CTCATTCAAC AAAAAATCA AAGAAAGTGA AGTCAAAAA GTCAAAGCCC 1980
TCATAAGACA TAAGTATAAA GGGAAAGCTT ATGAGATTCA GCTTAGCTCT GTAGAAAAA 2040
TTAACATAAC TGCTGGCCAT AGTCTGTTTA CAGTTAGAAA TGGAGAAATA AAGGAAGTTT 2100
CTGGAGATGG GATAAAAGAA GGTGACCTTA TTGTAGCACC AAAGAAAATT AACTCAATG 2160
AAAAAGGGGT AAGCATAAAC ATTCCTGAGT TAATCTCAGA TCTTCCGAG GAAGAAACAG 2220
CCGACATTGT GATGACGATT TCAGCCAAGG GCAGAAAGAA CTTCTTAAA GGAATGCTGA 2280
GAACTTAAG GTGGATGTTT GGAGAAGAAA ATAGAAGGAT AAGAACATT AATCGCTATT 2340
TGTTCCATCT CGAAAACTA GGCCTTATCA AACTACTGCC CCGCGGATAT GAAGTTACTG 2400
ACTGGGAGAG ATTAAGAAA TATAACAAC TTTACGAGAA GCTTGCTGGA AGCGTTAAGT 2460
ACAACGGAAC CAAGAGAGAG TATTAGTAA TGTCAACGA GATCAAGGAT TTTATATCTT 2520
ACTTCCACA AAAAGAGCTC GAAGAATGGA AAATTGGAAC TCTCAATGGC TTTAGAACGA 2580
ATTGTATTCT CAAAGTCGAT GAGGATTTG GGAAGCTCCT AGGTTACTAT GTTAGTGAGG 2640
GCTATGCAGG TGCACAAAAA AATAAACTG GTGGTATCAG TTATTCGGTG AAGCTTTACA 2700
ATGAGGACCC TAATGTTCTT GAGAGCATGA AAAATGTTGC AGAAAAATTC TTTGGCAAGG 2760
TTAGAGTTGA CAGAAATGCG GTAAGTATAT CAAAGAAGAT GGCATACTTA GTTATGAAAT 2820
GCCTCTGTGG AGCATTAGCC GAAAACAAGA GAATTCCTTC TGTTATACTC ACCTCTCCCG 2880
AACCGGATCG GTGGTCATTT TTAGAGGCGT ATTTTACAGG CGATGGAGAT ATACATCCAT 2940
CAAAAAGGTT TAGGCTCTCA ACAAAAAGCG AGCTCCTTGC AAATCAGCTT GTGTTCTTGC 3000
TGAACCTTTT GGGAATATCC TCTGTAAAGA TAGGCTTTGA CAGTGGGGTC TATAGAGTGT 3060
ATATAATGA AGACCTGCAA TTTCCACAAA CGTCTAGGGA GAAAAACACA TACTACTCTA 3120
ACTTAATTC CAAAGAGATC CTTAGGGACG TGTTTGAAA AGAGTTCCAA AAGAACATGA 3180
CGTTCAAGAA ATTTAAAGAG CTTGTTGACT CTGGAAAACT TAACAGGGAG AAAGCCAAGC 3240
TCTTGAGATT CTTCATTAAAT GGAGATATTG TCCTTGACAG AGTCAAAAGT GTTAAAGAAA 3300
AGGACTATGA AGGGTATGTC TATGACCTAA GCGTTGAGGA TAACGAGAAC TTTCTTGTG 3360
GTTTTGGTTT GCTCTATGCT CACAACAGCT ATTACGGCTA TATGGGGATA CCTAAGGCAA 3420
GATGGTACTC GAAGGAATGT GCTGAAAGCG TTACCGCATG GGGGAGACAC TACATAGAGA 3480
TGACGATAAG AGAAATAGAG GAAAAGTTCG GCTTTAAGGT TCTTTATGCG GACAGTGTCT 3540
CAGGAGAAAG TGAGATCATA ATAAGGCAAA ACGGAAAGAT TAGATTTGTG AAAATAAAGG 3600
ATCTTTTCTC TAAGGTGGAC TACAGCATTG GCGAAAAAGA ATACTGCATT CTCGAAGGTG 3660
TTGAAGCACT AACTCTGGAC GATGACGGAA AGCTTGTCTG GAAGCCCGTC CCCTACGTGA 3720
TGAGGCACAG AGCGAATAAA AGAATGTTC GCATCTGGCT GACCAACAGC TGGTATATAG 3780
ATGTTACTGA GGATCATTCT CTCATAGGCT ATCTAAACAC GTCAAAAACG AAAACTGCCA 3840
AAAAATCGG GGAAAGACTA AAGGAAGTAA AGCCTTTTGA ATTAGGCAAA GCAGTAAAT 3900
CGCTCATATG CCCAAATGCA CCGTTAAAGG ATGAGAATAC CAAAACAGC GAAATAGCAG 3960
TAAATTTCTG GGAGCTCGTA GGATTGATTG TAGGAGATGG AAAGTGGGGT GGAGATTCTC 4020
GTTGGGCAGA GTATTATCTT GGAATTTCAA CAGGCAAGA TGCAGAAGAG ATAAAGCAAA 4080
AACTTCTGGA ACCCCTAAAA ACTTATGGAG TAATCTCAA CTATTACCA AAAACGAGA 4140
AAGGGGACTT CAACATCTTG GCAAAGAGCC TTGTAAAGT TATGAAAAGG CACTTTAAGG 4200
ACGAAAAAGG AAGACGAAAA ATTCCAGAGT TCATGTATGA GCTTCCGGT ACTTACATAG 4260
AGGCATTCTC ACGAGGACTG TTTTCAGCTG ATGGTACTGT AACTATCAGG AAGGGAGTTC 4320

CAGAGATCAG GCTAACAAAC ATTGATGCTG ACTTTCTAAG GGAAGTAAGG AAGCTTCTGT 4380
 GGATTGTTGG AATTTCAAAT TCAATATTG CTGAGACTAC TCCAAATCGC TACAATGGTG 4440
 TTTCTACTGG AACCTACTCA AAGCATCTAA GGATCAAAAA TAAGTGCGCT TTTGCTGAAA 4500
 GGATAGGCTT TTAATCGAG AGAAAGCAGA AGAGACTTTT AGAACATTTA AAATCAGCGA 4560
 GGGTAAAAAG GAATACCATA GATTTTGGCT TTGATCTTGT GCATGTGAAA AAAGTCGAAG 4620
 AGATACCATA CGAGGGTTAC GTTTATGACA TTGAAGTCGA AGAGACGCAT AGGTTCTTTG 4680
 CAAACAACAT CCTGGTACAC AATACTGACG GCTTTTATGC CACAATACCC GGGGAAAAGC 4740
 CTGAATCAT TAAAAAGAAA GCCAAGGAAT TCCTAACTA CATAAACTCC AAATCTCCAG 4800
 GTCTGCTTGA GCTTGAGTAT GAGGGCTTTT ACTTGAGAGG ATTCTTTGTT AAAAAAAGC 4860
 GCTATGCAGT CATAGATGAA GAGGGCAGGA TAACAACAAG GGGCTTGGA GTAGTAAGGA 4920
 GAGATTGGAG TGAGATAGCT AAGGAGACTC AGGCAAAGGT TTTAGAGGCT ATACTTAAAG 4980
 AGGGAAGTGT TAAAAAGCT GATGAAGTGT TTAGAGATGT TGAGAGAAA ATAGCAAAAT 5040
 ACAGGGTTC ACTTGAAAAG CTTGTTATCC ATGAGCAGAT TACCAGGGAT TTAAAGGACT 5100
 ACAAGCCAT TGGCCCTCAT GTCGCGATAG CAAAAAGACT TGCCGCAAGA GGGATAAAAG 5160
 TGAACCGGG CACAATAATA AGCTATATCG TTCTCAAAGG GAGCGGAAAG ATAAGCGATA 5220
 GGGTAATTTT ACTTACAGAA TACGATCCTA GAAAACACAA GTACGATCCG GACTACTACA 5280
 TAGAAAACCA AGTTTGGCCG GCAGTACTTA GGATACTCGA AGCGTTTGA TACAGAAAGG 5340
 AGGATTTAAG GTATCAAAGC TCAAACAAA CCGGCTTAGA TGCATGGCTC AAGAGGTAGC 5400
 TCTGTTGCTT TTTAGTCCAA GTTCTCCGC GAGTCTCTCT ATCTCTCTT TGTATTCTGC 5460
 TATGTGGTTT TCATTACTA TTAAGTAGTC CGCCAAAGCC ATAACGCTC CAATTCCAAA 5520
 CTTGAGCTCT TTCCAGTCTC TGGCCTCAA TCACTCCAT GTTTTGGAT CGTCGCTTCT 5580
 CCCTCTTCTG CTAAGCCTCT CGAATCTTTT TCTTGGCGAA GAGTGTACAG CTATGATGAT 5640
 TATCTCTTCC TCTGGAACG CATCTTTAAA CGTCTGAATT TCATCTAGAG ACCTCACTCC 5700
 GTCGATTATA ACTGCCTTGT ACTTCTTTAG TAGTTCTTTT ACCTTTGGGA TCGTTAATTT 5760
 TGCCACGGCA TTGTCCCAA GCTCCTGCCT AAGCTGAATG CTCACACTGT TCATACCTTC 5820
 GGGAGTTCTT GGGATCC 5837

【図面の簡単な説明】

【図1】図のAは、EcoR I (レーン3)、BamH I (レーン4) 及びHind III (レーン5) で切断された*Pyrococcus* sp. DNAのエチジウムブロミド染色アガロースゲル電気泳動写真である。レーン1は、マーカーとしてHind IIIを有するλDNA切片であり、レーン2はマーカーとしてpBR322を有する。図のBは、Aと同一ゲルのサザンハイブリダイゼーションのオートラジオグラフィ写真である。32p-DNAプローブは、*Thermococcus litoralis* DNAポリメラーゼのアミノ末端部分をコードする1.3KbEcoRI断片から調製した。BamHI切断*Pyrococcus* sp. DNAはプローブを有する約4~5Kbの単一バンドを与えることに留意されたい。HindIII切断λDNAの23Kbバンドがフィルム上にはっきり現れるという事実は、そのバンドに存在する大量のDNAに対する非特異的ハイブリダイゼーションによるものである。プラスミドpBR322が明るく輝くという事実は、プローブ中の相同配列に依る。

【図2】図2は、大腸菌*E. coli* 2207 (NEB#720) のpUC19プラスミド中の*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼをコードする遺伝子を含む4.8Kb BamHI断片の制限部位

マップである。

【図3】図3は、Coomassie Blue染色ゲル電気泳動の写真であって、これから*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼのおよその分子量を決定した。レーン1の矢印はポリメラーゼバンドを示す。レーン2は指示分子量標準を含有する。

【図4】図4は、*Thermococcus litoralis* DNAポリメラーゼと*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼを比較する、電気泳動後のウエスタンブロットの写真である。レーン1、タンパク質標準；レーン2、*Thermococcus litoralis* の50μgの粗抽出物；レーン3、2.0μgの精製組換え*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼ。矢印はポリメラーゼIの位置を示す。

【図5】図5は、*Thermococcus litoralis* DNAポリメラーゼ及び*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼの重合及びエキソヌクレアーゼ機能の比較である。*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼが*T. litoralis* DNAポリメラーゼより2.5倍強いエキソヌクレアーゼ活性をもつことを示している。

【図6】図6は、組換え*Pyrococcus* sp. DNAポリメラーゼの95℃ (○) 及び100℃

() での熱安定性を示す。

【図1】

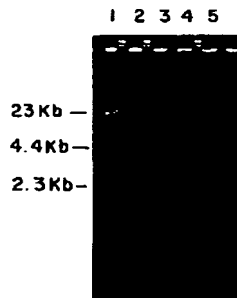


FIG. 1

【図2】

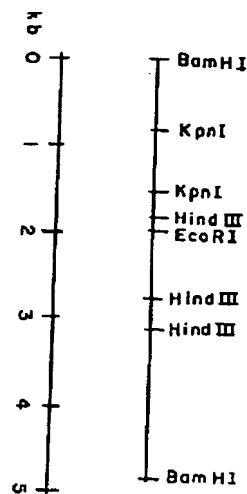


FIG. 2

【図3】

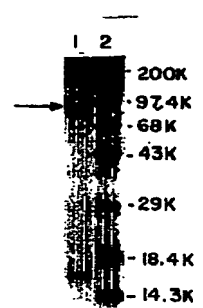


FIG. 3

【図4】

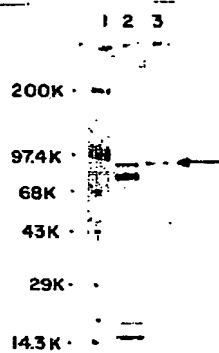


FIG. 4

【図5】

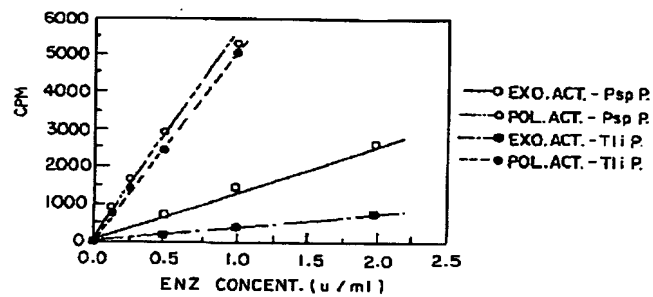


FIG. 5

【図6】

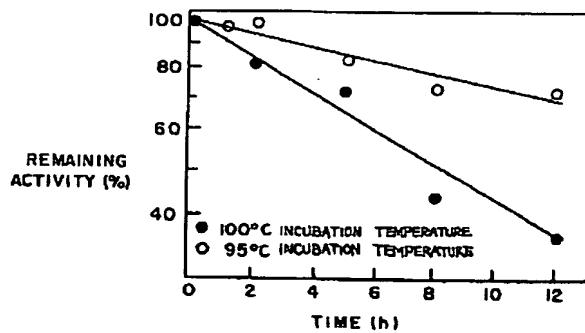


FIG. 6

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 N 15/54				
C 1 2 R 1:01)				
(72)発明者 フランシーン・パーラー アメリカ合衆国、マサチューセッツ・ 02146、ブルツクリン、フラー・ストリー ト・74・エイ			(72)発明者 ヒューミン・コン アメリカ合衆国、マサチューセッツ・ 01915、ピバリー、アール・イーノン・ス トリート・38、アパートメント・208	
(72)発明者 レベツカ・クセラ アメリカ合衆国、マサチューセッツ・ 01915、ピバリー、ネプチューン・ストリ ート・28			(72)発明者 ウイリアム・イー・ジャック アメリカ合衆国、マサチューセッツ・ 01984、ウエーナム、メイフラワー・ドラ イブ・31	